

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN MOLEKUL ADHESIN 49,8 kDa SUB UNIT**

**PILI *Shigella flexneri* TERHADAP JUMLAH KOLONI *Vibrio cholerae***

**PADA USUS MENCIT MODEL DIARE *Vibrio cholerae***

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:**

**Rafif Ulya Aditya**

**NIM: 155070100111013**

**PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan .....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak .....	vi
Abstract .....	vii
Daftar Isi .....	viii
Daftar Lampiran.....	x
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Singkatan .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan Umum .....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat Akademis .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Shigella flexneri</i> .....	6
2.1.1 Taksonomi <i>Shigella flexneri</i> .....	6
2.1.2 Identifikasi dan Morfologi <i>Shigella flexneri</i> .....	6
2.1.3 Patogenesis dan Patologi Diare karena <i>Shigella flexneri</i> .....	7
2.1.4 Molekul adhesin <i>Shigella flexneri</i> .....	9
2.2 <i>Vibrio cholerae</i> .....	10
2.2.1 Tasonomi <i>Vibrio cholerae</i> .....	10
2.2.2 Indentifikasi dan Morfologi <i>Vibrio cholerae</i> .....	11
2.2.3 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis .....	12
2.2.4 Patogenesis dan patologi diare karena <i>Vibrio cholerae</i> .....	13
2.3 Vaksinasi .....	14
2.3.1 Molekul Adhesi sebagai Target Vaksin .....	16

<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	18
3.2 Deskripsi Kerangka Konsep .....	19
3.3 Hipotesis Penelitian .....	20
<b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
4.1 Rancangan Penelitian .....	21
4.2 Jumlah Sampel .....	21
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	22
4.4 Variabel Penelitian .....	22
4.4.1 Variabel Bebas .....	22
4.4.2 Variabel Terikat .....	23
4.5 Definisi Operasional .....	23
4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian .....	24
4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data .....	25
4.8 Pengolahan Data .....	30
4.9 Alur Penelitian .....	32
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>	<b>33</b>
5.1 Hasil Penelitian .....	33
5.1.1 Hasil SDS Page .....	33
5.1.2 Hasil Purifikasi Protein dengan Elektroelusi .....	34
5.1.3 Hasil Perhitungan Jumlah koloni .....	34
5.2 Analisis Data .....	36
5.2.1 Deskripsi Hasil <i>SDS PAGE</i> .....	36
5.2.2 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas .....	37
5.2.3 Uji <i>Kruskal Wallis</i> .....	38
5.2.4 Uji <i>Mann-Whitney</i> .....	39
<b>BAB VI PEMBAHASAN .....</b>	<b>41</b>
<b>BAB VII PENUTUP .....</b>	<b>45</b>
7.1 Kesimpulan .....	45
7.2 Saran .....	45
Daftar Pustaka .....	46
Lampiran .....	51

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN MOLEKUL ADHESIN 49,8 kDa SUB UNIT  
PILI *Shigella flexneri* TERHADAP JUMLAH KOLONI *Vibrio cholerae* PADA  
USUS MENCIT MODEL DIARE *Vibrio cholerae***

Oleh:

**Rafif Ulya Aditya**

**NIM. 155070100111013**

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 7 Februari 2019

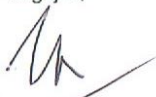
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Isngadi, M.Kes., Sp.An, KAO

NIP. 196506111996011001

Pembimbing I/Penguji II,



Prof. Dr.dr.Sumarno, DMM, Sp.MK(K)

NIP. 194807061980021001

Pembimbing II/Penguji III,



Dr.dr.Masruroh Rahayu, M.Kes

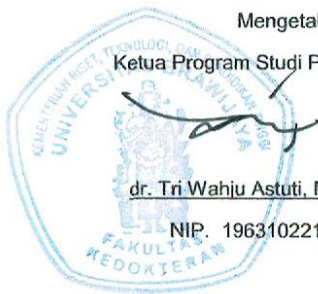
NIP. 195909261984032003

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001



## ABSTRAK

Aditya, Rafif Ulya. 2019. **Pengaruh Pemberian Vaksin Molekul Adhesin 49,8 kDa Sub Unit Pili *Shigella flexneri* Terhadap Jumlah Koloni *Vibrio cholerae* pada Usus Mencit Model Diare *Vibrio cholerae***. Tugas akhir, Program Studi S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK(K). (2) Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

Imunisasi pada diare sudah berkembang dengan ditemukannya molekul adhesin *Shigella dysenteriae* dengan berat molekul adhesin 49.8 kDa dan molekul adhesin 7.9 kDa yang mempunyai reaksi silang antara keduanya. Ditemukan pula molekul adhesin sebesar 37,8 pada *Vibrio cholerae* yang protektif terhadap diare. Reaksi silang molekul 7,9 kDa dan 49,8 kDa pada *Shigella flexneri* berpeluang pula memiliki reaksi silang dengan molekul 37.8 kDa *Vibrio cholerae* karena sifat dan bahan dasar yang sama sehingga berpeluang menciptakan vaksin homolog antara keduanya.

Terdapat perlakuan pada sampel, yaitu kontrol positif (infeksi *Vibrio cholerae*), kontrol imunisasi dengan molekul adhesi 49.8 kDa *Shigella flexneri* dan kelompok perlakuan imunisasi molekul adhesi 37.8 kDa *Vibrio cholerae*. Berdasarkan hasil analisis *Kruskal Wallis* dan uji *post hoc Mann-Whitney* terdapat penurunan Jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada imunisasi 49.8 kDa *Shigella flexneri* turun signifikan dibanding kelompok kontrol positif. Jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada imunisasi 37.8 kDa *Vibrio cholerae* turun signifikan dibanding kelompok kontrol positif, Serta tidak ada perbedaan pada kedua pemberian imunisasi. Dapat disimpulkan kedua molekul adhesin 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dan 49.8 kDa *Shigella flexneri* bersifat protektif mencegah Shigellosis pada mencit. Adanya kesamaan sifat tersebut mengindikasikan reaksi silang respon imun antara molekul adhesin *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri*.

**Kata kunci:** diare, molekul adhesi 37.8 *Vibrio cholerae*, molekul adhesi 49.8 kDa *Shigella flexneri*.

## ABSTRACT

Aditya, Rafif Ulya. 2019. **The Effect of Adhesin Molecules Vaccine 49,8 kDa Sub Unit *Pili Shigella flexneri* in Decreasing the Number of *Vibrio cholerae* Colonies in the Mice Intestine Secret of Model *Vibrio cholerae* Diarrhea.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya.  
Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, Sp. MK(K). (2) Dr. dr. Masrurah Rahayu, M.Kes

Immunization in diarrhea has developed with the discovery of the *Shigella dysenteriae* adhesion molecule with molecular weight 49.8 kDa and 7.9 molecule which has a cross reaction. Also found adhesion molecule 37.8 in *Vibrio cholerae* which is protective against diarrhea. Molecular cross reactions of 7.9 kDa and 49.8 kDa in *Shigella flexneri* also have potential to have a cross reaction with molecule 37.8 kDa *Vibrio cholerae* because of the same basic properties so that they have the opportunity to be a homologous vaccine.

There are 3 sample groups positive control (*Vibrio cholerae* infection), immunization control with adhesion molecule 49.8 kDa *Shigella flexneri* and adhesion molecule immunization 37.8 kDa *Vibrio cholerae* group. Based on the results of the Kruskal Wallis analysis and the Mann-Whitney post hoc test, The number of *Vibrio cholerae* colonies in control group with immunization of 49.8 kDa *Shigella flexneri* dropped significantly compared to the positive controls. The number of *Vibrio cholerae* colonies in controls treatment with 37.8 kDa *Vibrio cholerae* drop significantly compared to the positive. And there were no differences between both of immunization. It can be concluded adhesin molecules 37.8 kDa *Vibrio cholerae* and 49.8 kDa *Shigella flexneri* are protective to protect diarrhea in mice. The similarity of these characteristics indicates a cross reaction of the immune response between adhesion molecules *Vibrio cholerae* and *Shigella flexneri*.

**Keywords:** diarrhea, adhesion molecule 37.8 *Vibrio cholerae*, adhesion molecule 49.8 kDa *Shigella flexneri*.



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Hingga saat ini diare masih menjadi salah satu masalah kesehatan yang umum bagi masyarakat, terutama di negara berkembang. Berdasarkan data penyakit menular di Indonesia, diare menjadi penyebab kematian terbanyak ketiga setelah tuberkulosis dan pneumoniae (Jendela Datinkes, 2011). Setiap tahun, terdapat sekitar 1,7 milyar kasus diare pada anak di dunia. Penyakit ini juga menjadi penyebab utama terjadinya malnutrisi pada anak (WHO, 2017).

Penyebab diare diantaranya disebabkan oleh bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*. *Shigella* adalah bakteri penyebab diare berdarah atau disentri. Bakteri ini menginvasi sel epitel usus besar dan kemudian mengaktifkan berbagai proses inflamasi di dalam usus. Selain itu, ada beberapa spesies *Shigella* yang memproduksi *Shiga toxin* yang dapat memperburuk manifestasi klinis disentri. (Ochoa dan Cleary, 2015). Sedangkan *Vibrio* adalah penyebab penyakit kolera. Bakteri ini melakukan adhesi kepada sel epitel usus dan kemudian melakukan perbanyakan diri. Setelah itu bakteri *Vibrio* mengeluarkan bahan metabolit seperti *cholera-toxin* yang berperan pada terjadinya diare.

Vaksinasi merupakan salah satu metode peningkatan imunitas terhadap patogen tertentu dengan cara memasukkan komponen imunogenik non-virulen/non-toksik, sehingga antibodi dan imunitas seluler dapat terstimulasi. Peningkatan efektor sistem imun merupakan hasil respon dari vaksinasi dan menjadi salah satu tanda berhasilnya metode ini. Vaksinasi juga terbukti paling efektif dalam eradikasi penyakit infeksi. Menurut data, vaksinasi mencegah kematian hingga 3 milyar jiwa tiap tahun (WHO, 2017).

Sampai saat ini, telah ditemukan vaksin berbahan dasar *whole cell* seperti *A formalin-inactivated S. sonnei vaccine* (SsWC) yang sediaannya berupa *oral, killed, whole-cell vaccine* (McKenzie R, 2006). Namun seperti yang kita tahu, vaksin yang berbahan dasar *whole cell* memiliki efek samping tertentu bagi penggunaannya. Oleh sebab itu, untuk mengurangi risiko efek samping yang ditimbulkan perlu adanya alternatif vaksin yang tidak berbahan dasar *whole cell*.

Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa protein hemagglutinin subunit pili *S. dysenteriae* dengan berat molekul 49,8 kDa (Sumarno *et al.* 2015). Protein tersebut ternyata bersifat protektif untuk mencegah diare *Shigella* pada mencit. Oleh karena itu, protein ini pantas dijadikan kandidat vaksin *Shigella* yang ideal karena bahan dasarnya bukan merupakan *whole cell* yang dapat menyebabkan efek samping bagi penggunaannya. Selain protein dengan berat molekul 49,8 kDa, pada pili *Shigella flexneri* juga



ditemukan molekul adhesin dengan berat molekul 7,9 kDa, yang ternyata memiliki reaksi silang dengan subunit pili berat molekul 49,8 kDa (Khoirul *et al.*, 2015). Dengan ditemukannya reaksi silang tersebut, menambah pilihan kandidat vaksin yang bisa digunakan untuk proteksi disentri di masa depan, yang masih belum diketahui masing-masing keunggulannya.

Vaksin kolera idealnya mengandung molekul adhesi dan sub unit B CT, diberikan per oral, bertahan lama dan juga memiliki resiko kecil menimbulkan diare (Finkelstein R.A., 1983). sementara itu, protein hemagglutinin sub unit *Vibrio cholerae* yang memiliki berat 37,8 kDa juga bersifat protektif untuk mencegah diare pada menci.

Pada diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholera* juga ditemukan vaksin yang berbahan dasar molekul adhesin dan bersifat hemagglutinin. berangkat dari reaksi silang antara subunit pili dengan berat molekul 49,8 kDa dan 7,9 kDa pada *Shigella flexneri*, peneliti ingin mengetahui apakah terdapat terdapat reaksi silang respon imun antara molekul adhesin *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* untuk mendapatkan kandidat vaksin yang homolog antara kolera dan *Shigellosis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah terdapat reaksi silang antara molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholera* dengan molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*?

- 1.2.2 Apakah pemberian vaksin molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* pada mencit model diare *Vibrio cholerae* dapat menurunkan jumlah koloni dari bakteri *Vibrio cholerae*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan adanya reaksi silang respon imun antara molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholera* dengan molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

Membuktikan adanya penurunan jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada mencit model diare *Vibrio cholerae* setelah divaksinasi dengan molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

Peneliti mendapat pengalaman dan pembelajaran serta dapat digunakan sebagai referensi untuk penyempurnaan hasil penelitian yang bermanfaat untuk pengembangan profesi.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat dijadikan sebagai pertimbangan untuk menciptakan alternatif baru mendapatkan kandidat vaksin homolog antara *Shigellosis* dan kolera.

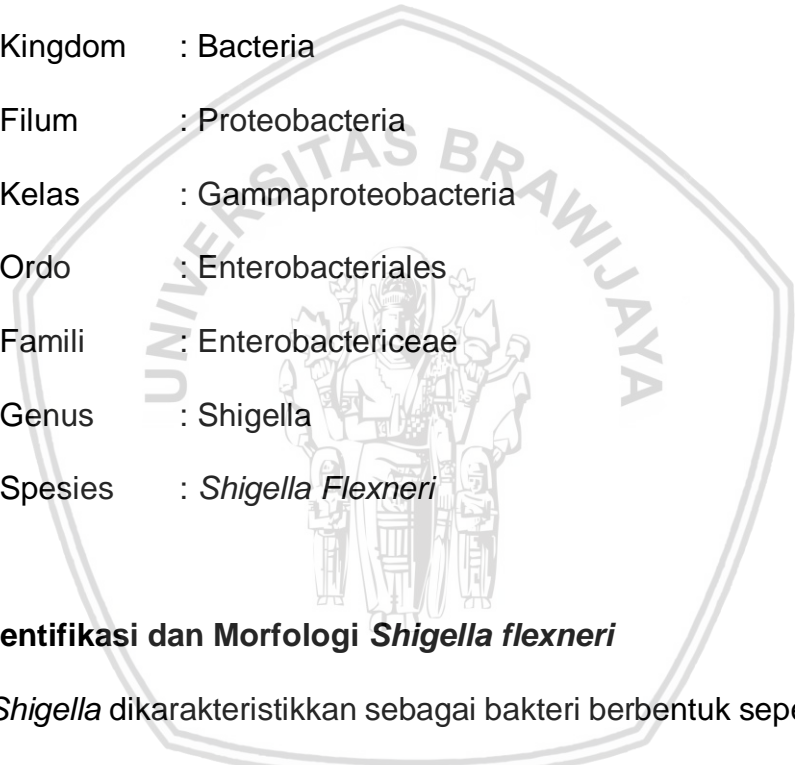


## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Shigella flexneri*

##### 2.1.1 Taksonomi *Shigella flexneri*

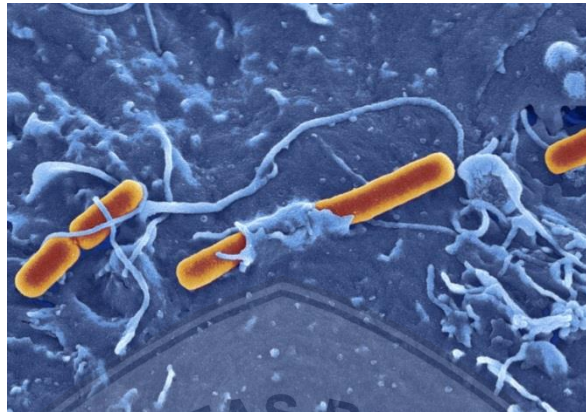


Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Shigella
Spesies	: <i>Shigella Flexneri</i>

##### 2.1.2 Identifikasi dan Morfologi *Shigella flexneri*

*Shigella* dikarakteristikkan sebagai bakteri berbentuk seperti batang, fakultatif anaerob, non-motil dan tidak memfermentasi laktosa, melainkan jenis karbohidrat lainnya dengan hasil berupa asam. Selain itu *Shigella* tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S (Brooks, 2013). Berdasarkan reaksi biokimiawi dan antigen O spesifik, *Shigella* terbagi kedalam empat spesies, yakni *S. dysenteriae* (serogrup A), *S. flexneri* (serogrup B), *S. boydii* (serogrup C), dan *S. sonnei* (serogrup D) (Mao, 2013). Distribusi spesies dan serotipe *Shigella* sangat heterogen berdasarkan waktu dan lokasi. Di negara

berkembang, penyebab utama infeksi *Shigella* adalah *S. flexneri* dengan estimasi jumlah sebesar 60% (Lima, 2015).



Gambar 2.1. Visualisasi morfologi *Shigella flexneri*

Sumber: <https://wellcomeimages.org>

*Shigella flexneri* adalah bakteri penyebab shigellosis yang ditransmisikan secara fekal-oral dengan manifestasi utama berupa diare akibat proses invasi epitel usus manusia. Gambar diatas merupakan hasil *scanning* mikroskop elektron interaksi *Shigella* terhadap sel stem sebagai *host*. Gambar tersebut menunjukkan bahwa setelah bakteri melakukan kontak dengan sel *host*, terjadi pembentukan struktur yang mengelilingi *Shigella* yang memediasi proses internalisasi *S. flexneri*.

### 2.1.3 Patogenesis dan Patologi Diare karena *Shigella flexneri*

*Shigella* merupakan salah satu patogen yang sangat infeksius, ingesti 10 -100unit bakteri saja telah adekuat sebagai dasar perkembangan infeksi *Shigellosis*, hal ini didukung oleh karakteristik *Shigella* yang resisten terhadap lingkungan asam sehingga memudahkannya melewati barrier kimiawi lambung hingga menuju ke usus (Sansonetti, 2001). Patogenesis infeksi *Shigella flexneri* banyak dikaitkan dengan kemampuan bakteri untuk melakukan invasi dan replikasi pada epitel usus sehingga memicu

inflammasi serta destruksi epitel. Penetrasi *S. flexneri* ke dalam epitel terjadi melalui sel M (*membranous epithelial cell*). Kemudian, *S. flexneri* menginduksi respons inflamasi berupa fagositosis oleh makrofag, namun *S. flexneri* memiliki mekanisme evasi berupa *invasion plasmid antigen-B* (Ipa-B) yang berfungsi sebagai agen litik vakuol fagositosis sehingga *S. flexneri* mampu menghindari degradasi oleh enzim lisosom dan bebas menuju sitoplasma. Setelah mencapai sitosol, Ipa-B berperan sebagai aktivator caspase-1 sebagai agen pro-apoptotik makrofag sehingga *S. flexneri* dapat bebas sekali lagi menuju sub-mukosa usus. Setelah mencapai sisi basolateral enterosit, maka *S. flexneri* memulai proses invasi yang dimediasi oleh IpA-IpaD dan diinjeksikan dengan sistem injeksi sekresi (tipe III), sehingga terjadi re-organisasi sitokeleton, polimerisasi aktin, dan perubahan lainnya pada permukaan sel. Perubahan tersebut dimanfaatkan oleh *S. flexneri* untuk menginduksi proses internalisasi *S. flexneri* dengan pembentukan vakuola sehingga memudahkan kontak antara *S. flexneri* dengan sitoplasma sel epitel. Selain itu, proses tersebut dapat meningkatkan motilitas *S. flexneri* dengan penyusunan “ekor” aktin (Jennison dan Verma, 2004).

Pada fase selanjutnya, enterosit mengalami kerusakan oleh *S. flexneri* dengan cara pelisisan membran sel dan membentuk fokus ulkus mukosa, kemudian kerusakan semakin meluas hingga mencapai lamina propria dan memicu reaksi inflamasi yang lebih berat seperti abses. Diare yang termanifestasi dari proses ini merupakan jenis inflamatori yang



ditandai dengan volume yang sedikit dan mengandung sel darah putih, sel darah merah, bakteri, dan debris seluler lainnya (Ryan, 2014).

#### 2.1.4 Molekul Adhesin *Shigella flexneri*

Secara umum, patogenesis infeksi diawali oleh proses perlekatan atau adhesi antara pathogen dan sel *host* yang dimediasi oleh suatu molekul adhesi. Selain sebagai mediator pembentukan ikatan dan komunikasi antar sel terkait patogenesis infeksi, molekul adhesi juga berperan dalam proses pertumbuhan sel, imunitas (rekognisi patogen), serta penyembuhan luka. Pada tahun 1996, Funato dan Sasakawa menemukan bahwa sekresi kompleks protein IpaBCD *Shigella flexneri* oleh sistem tipe III berikatan dengan  $\beta 1$ -integrin yang terhubung dengan sitokeleton aktin via C-terminus, hal ini menggambarkan bahwa interaksi IpaBCD dengan molekul integrin mampu memediasi invasi *Shigella flexneri* pada sel *host*. Kemudian pada tahun 1999, dari studi yang dilakukan oleh Nhieu dan Sansonetti didapatkan hasil yang serupa, yakni melalui kompleks IpaBCD bakteri *Shigella flexneri*, terjadi ikatan integrin  $\alpha 5 \beta 1$  sel *host*. Hal ini kemudian diikuti oleh proses internalisasi *S. flexneri* dependen Rho GTPase (Kerr, 2017). Hasil tersebut mempertegas konsep peranan molekul adhesi sebagai fasilitator invasi serta internalisasi *Shigella flexneri* terhadap sel *host*.

Hingga saat ini studi mengenai identifikasi molekul adhesi *Shigella flexneri* terus berkembang, Milliane *et al* (2017) menyatakan bahwa protein

membran luar (OMP/ *outer membrane protein*) *Shigella flexneri* dapat berperan sebagai molekul adhesi. Berdasarkan analisis SDS-PAGE, tes hemaglutinasi, dan tes adhesi diketahui bahwa OMP 28 kDa memiliki kemampuan hemaglutinasi tertinggi. Hemagglutinasia merupakan kemampuan suatu mikroorganisme dalam menyebabkan agregasi sel darah merah oleh molekul hemagglutinin yang merupakan glikoprotein pada permukaan eritrosit. Reseptor permukaan eritrosit dan mukosa sel *host* memiliki tingkat homologi yang signifikan, sehingga kemampuan bakteri menempel pada eritrosit tersebut dapat dijadikan dasar penentuan OMP sebagai molekul adhesi. Penemuan tersebut kemudian dapat menjadi dasar pemanfaatan molekul adhesi OMP 28 kDa sebagai pengembangan inovasi terapi infeksi *Shigella* berbasis vaksinasi.

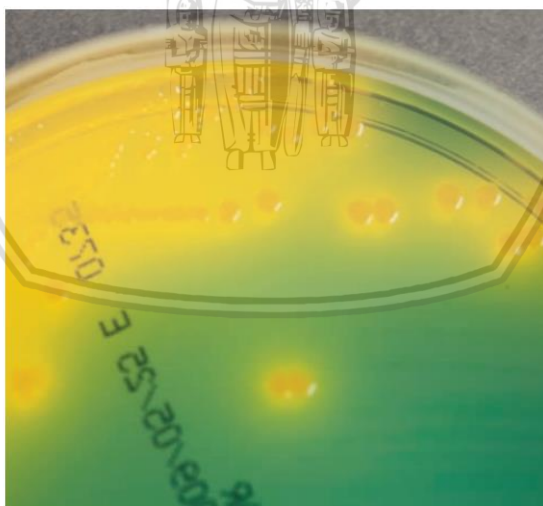
## **2.2 *Vibrio cholerae***

### **2.2.1 Taksonomi *Vibrio cholerae***

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>V. Cholerae</i>

### 2.2.2 Identifikasi dan Morfologi *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* pada pewarnaan Gram tergolong Gram negatif, berbentuk batang yang bengkok seperti koma dengan panjang 0,5 X 1,5 sampai 3,0  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini secara aktif motil dengan menggunakan flagella pada ujungnya. *V.cholerae* tumbuh dengan baik pada medium agar *thiosulfate citrate bile sucrose* (TCBS), yang merupakan medium selektif untuk genus *Vibrio*. Pada medium ini *vibrio cholerae* membentuk koloni kuning (fermentasi sukrosa) yang terlihat jelas di atas latar belakang warna hijau gelap dari medium TCBS. *Vibrio* tumbuh pada pH yang sangat tinggi (8,5-9,5) dan tidak dapat hidup dalam suasana asam. *Vibrio* bersifat oksidase positif, yang membedakan bakteri ini dengan famili *enterbacterceae* lainnya.



Gambar 2.2. Koloni *Vibrio cholerae* pada Medium Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS)

### 2.2.3 Struktur Antigenik dan Klasifikasi Biologis

Banyak spesies dari *Vibrio* yang memiliki satu antigen flagellar H yang sama. Antibodi terhadap antigen H nampaknya tidak terlibat dalam proteksi inang yang rentan. *Vibrio cholerae* memiliki lipopolisakarida O yang memberikan spesifisitas secara serologis. Diperkirakan terdapat sekitar 206 grup berdasarkan antigen O. Strain *Vibrio cholerae* O1 dan O 139 menyebabkan manifestasi klinis kolera klasik sedangkan selain strain O1/O139 menyebabkan *cholerae-like disease*. Antibodi terhadap antigen O cenderung bersifat protektif terhadap hewan coba yang diinfeksi dengan *Vibrio cholerae*. Antigen *Vibrio cholerae* serogrup O1 memiliki berbagai determinan yang membuat adanya klasifikasi yang lebih dalam lagi yaitu dalam bentuk tiga serotipe Ogawa, Inaba, dan Hikojima. Dua biotipe *Vibrio cholerae* epidemik juga telah teridentifikasi yaitu biotipe klasik dan El Tor. Biotipe El Tor memproduksi hemolisin sehingga membuat hasil positif pada uji Voges Proskauer. Biotipe ini juga resisten terhadap Polymixin B. *Vibrio cholerae* strain O 139 sangat mirip dengan *Vibrio cholerae* O1 biotipe El Tor namun tetap saja strain O139 tidak bisa memproduksi lipopolisakarida O1 dan tidak memiliki gen yang dibutuhkan untuk membentuk antigen ini. *V.cholerae* strain O139 membentuk kapsul lipopolisakarida seperti strain non-O1 lainnya, sedangkan strain O1 tidak membentuk kapsul.

#### 2.2.4 Patogenesis dan patologi diare karena *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* hanya bersifat patogenik pada manusia. Karena bakteri ini tidak tahan asam, maka untuk menjadi sakit seseorang dengan asam lambung yang normal butuh untuk menelan sekitar lebih dari  $10^{10}$  bakteri dalam air sebagai *transportemnya*. Apabila *transportemnya* berupa makanan maka butuh jumlah yang lebih sedikit yaitu sekitar  $10^2$ - $10^4$  bakteri untuk menjadi sakit. Kondisi yang menyebabkan asam lambung seseorang menurun akan mencetuskan seseorang untuk lebih rentan terinfeksi *Vibrio cholerae*. Bakteri ini pada awalnya akan menempel pada brush bordel dari sel epitel usus halus yang kemudian akan multiplikasi dan menyebarkan toxin cholera juga mucinase dan endotoxin. Enterotoksin *Vibrio cholerae* yang bersifat *heat labile* terdiri atas subunit A dan subunit B. Subunit B akan menempel pada reseptor mukosa ganglioside  $GM_1$  yang kemudian akan mencetuskan subunit A untuk masuk ke dalam sel. Aktivasi toksin subunit A menyebabkan peningkatan kadar *cyclic adenosine monophosphate* (camp) sehingga menyebabkan hipersekresi air dan elektrolit. Adanya peningkatan sekresi *sodium dependent chloride* dan penghambatan absorpsi sodium dan chlorida pada microvili menyebabkan pengeluaran cairan diare yang kaya akan elektrolit (20-30L/hari) sehingga menyebabkan dehidrasi, syok, asidosis, dan bahkan kematian.

Tahap perlekatan atau adhesi pada epitel usus halus merupakan tahap awal yang sangat penting bagi patogenesis diare kolera. Perlekatan tersebut diperankan oleh protein bakteri yang dikenal sebagai *adherent*

*molecule* (molekul adesi) yang akan menempel pada *receptor molecule* (molekul reseptor) pada sel epitel. Karakterisasi molekul adhesi bakteri terdapat pada dua tempat yaitu pada pili dan *outer membrane protein* (omp). Terdapat beberapa laporan yang menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul sekitar 38 kDa pada OMP merupakan molekul adhesin, seperti yang dilaporkan oleh Sumarno *et al*/ bahwa protein dengan berat molekul 37,8 kDa pada OMP *Vibrio cholerae* O1 M094V galur Indonesia (Malang) bersifat hemagglutinin dan dikarakterisasi sebagai molekul adhesin. Selain melaporkan molekul adhesin pada omp, Sumarno *et al* juga menemukan beberapa protein yang bersifat sebagai molekul adhesin pada pili bakteri yang sama yaitu protein dengan berat molekul 50,3 kDa, 37,8 kDa, 35,6 kDa, dan 21,3 kDa. Ditemukannya molekul adhesin pada *Vibrio cholerae* membuka peluang baru untuk diciptakannya kandidat vaksin masa depan yang akan mencegah perlekatan bakteri pada sel epitel usus halus sehingga bakteri tidak bisa mengeluarkan toksin dan sekret berbahaya lainnya.

### 2.3 Vaksinasi

Vaksinasi adalah menjadi salah satu langkah untuk meningkatkan imunitas. Vaksin sebagai preparasi biologis yang berguna untuk meningkatkan imunitas pada penyakit tertentu. Terdapat banyak jenis dari vaksin berdasarkan jenis antigen yang digunakan. Tipe vaksin *Live attenuated vaccine* (LAV) menggunakan antigen dari bakteri ataupun virus



yang masih hidup dan dilemahkan untuk menginduksi sistem imun tubuh. Beberapa vaksin yang menggunakan LAV adalah vaksin untuk penyakit Tuberkulosis yaitu vaksin BCG. Selain itu juga vaksin polio per oral, measles, rotavirus dan demam kuning. Bila antigen yang digunakan adalah bakteri yang sudah dimatikan atau virus yang dinonaktifkan terdapat pada *whole-cell* pertusis dan polio (IPV). Terdapat juga tipe vaksin yang menggunakan subunit antigen tertentu yang sudah dimurnikan. Contoh dari tipe ini adalah pertusis (aP), *Haemophilus influenzae* tipe b (Hib), pneumokokus, dan hepatitis. Beberapa vaksin menggunakan toksin yang disekresikan oleh bakteri yang menginfeksi. Vaksin yang menggunakan cara ini adalah tetanus dan difteri.

Antigen dari virus atau bakteri ini akan dimasukkan dalam tubuh dan akan menginduksi immunitas tanpa menimbulkan penyakit. Vaksinasi ini juga mampu menurunkan resiko penyakit berkembang menjadi lebih berat dikarenakan sudah terbentuknya kekebalan dari respon imun pertama yang diinduksi vaksin. Pada vaksin dengan antigen protein, toksin, LAV baik yang bakteri maupun virus akan ditangkap oleh APC dan merespon melalui sekresi antibodi melalui sel T (*T-dependent antibody response*). Sedangkan pada vaksin dengan antigen berupa polisakarida dapat menginduksi respon dari sel B tanpa melalui sel T (*T-independent antibody response*). Antibodi yang terbentuk melalui jalur ini dianggap masih kurang baik dikarenakan memorinya yang singkat dan afinitasnya yang rendah dibandingkan melalui jalur produksi antibodi dengan melalui sel T. Oleh karena itu dibutuhkan

konjugasi dari PS dengan protein pembawa yang akan menyebabkan peptida tidak dikenali dan menarik sistem imun untuk merespon melalui sel T. Imunitas jangka panjang dinilai dari pemeliharaan dari efektor dari antigen spesifik atau induksi dari sel memori yang efisien dan cukup cepat diaktivasi kembali pada paparan patogen.(Siegrist, 2008).

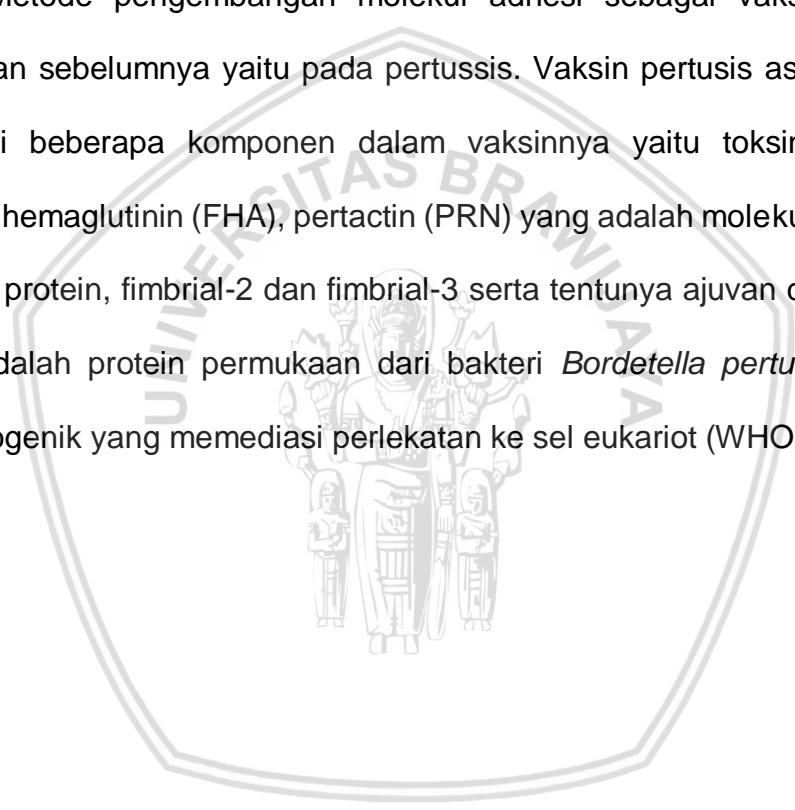
Vaksinasi dengan melalui mukosa dinilai lebih baik meskipun per oral, nasal, rectal maupun vaginal dikarenakan sebagian besar infeksi berawal dari mukosa dan dapat kemampuannya menginduksi respon imun protektif. Target dari vaksinasi dapat digunakan untuk menginduksi imunitas untuk mencegah perlekatan dan terbentuknya kolonisasi bakteri di mukosa, mencegah bakteri berpenetrasi dan replikasi di mukosa atau mencegah toksin dari bakteri merusak epitel dan target selnya. Membran mukosa di intestinal memiliki kekhususan dalam menginduksi sistem imun mukosa yang melindungi permukaan dari patogen. Sistem imun mukosa memiliki 3 fungsi utama yaitu perlindungan membran mukosa dari invasi dan kolonisasi bakteri, mencegah pembentukan antigen dari makanan, materi udara dan mikrobiota serta mencegah perkembangan dari respon imun yang berbahaya. (Holmgren, 2005).

### **2.3.1 Molekul Adhesi sebagai Target Vaksin**

Molekul adesi adalah berperan penting dalam kolonisasi. Bakteri ekstraseluler perlu menjaga posisinya untuk menginfeksi sel inang. Adesi ini mencegah bakteri patogen tersingkirkan dan memberi keuntungan untuk

bakteri normal flora. Pada bakteri intraseluler, adhesin setelah berikatan dengan permukaan sel inang juga memicu terjadinya internalisasi dari bakteri ke dalam sel inang. Salah satu struktur bakteri yang terlibat dalam perlekatan bakteri ke sel inang adalah pili. Adesi dari bakteri ke sel inang berperan dalam pembentukan biofilm (Ribet, 2015).

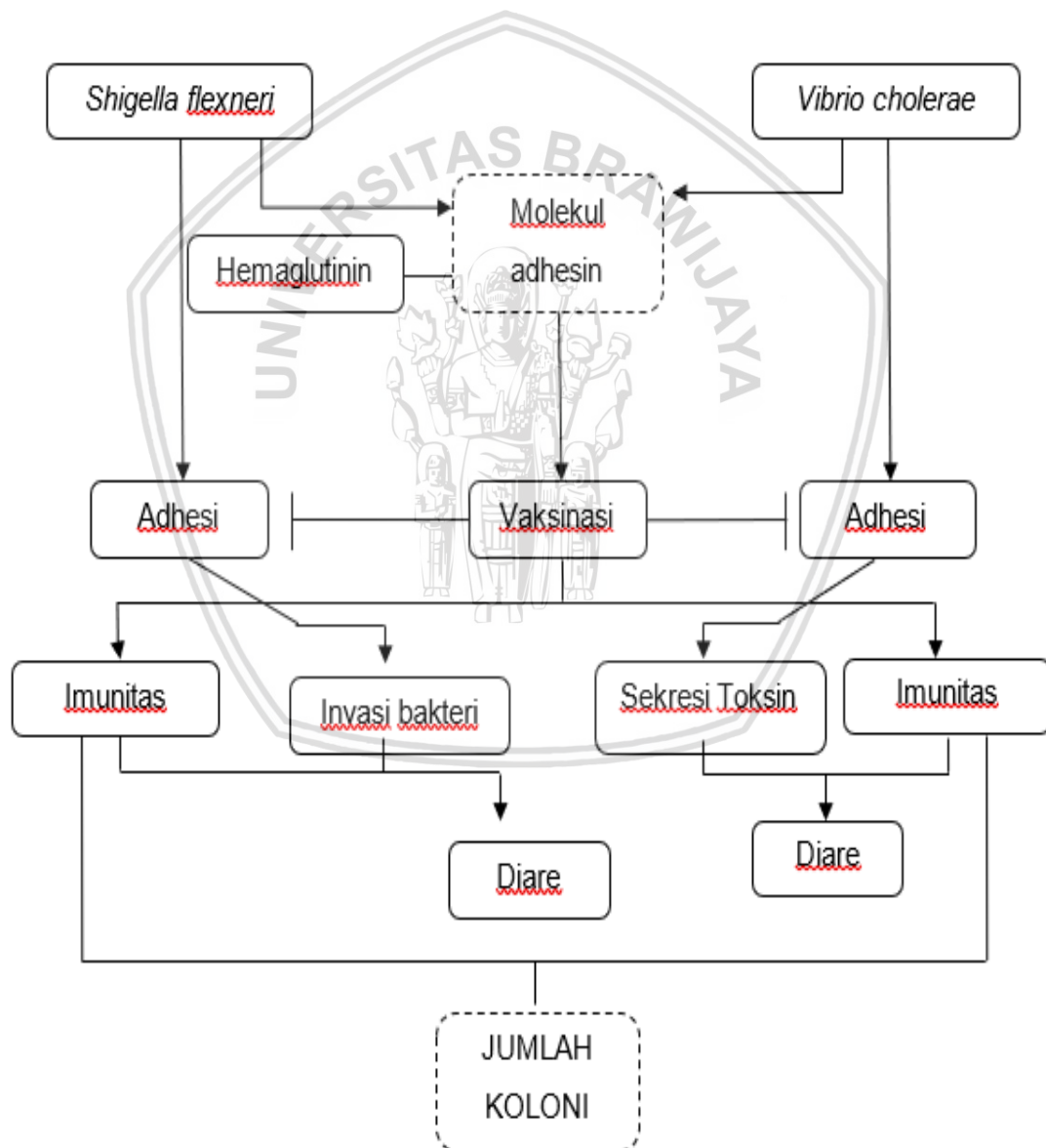
Metode pengembangan molekul adhesi sebagai vaksin pernah dilakukan sebelumnya yaitu pada pertussis. Vaksin pertusis aseluler (aP) memiliki beberapa komponen dalam vaksinnya yaitu toksin pertusis, filamen hemagglutinin (FHA), pertactin (PRN) yang adalah molekul adesi 68-70 kDa protein, fimbrial-2 dan fimbrial-3 serta tentunya adjuvan dari vaksin. PRN adalah protein permukaan dari bakteri *Bordetella pertussis* paling imunogenik yang memediasi perlekatan ke sel eukariot (WHO, 2009).



## BAB 3

### KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### 3.1. Kerangka Konsep



Keterangan:



: mempengaruhi



: menghambat



: variabel yang diteliti



: variabel yang tidak diamati secara langsung

### 3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Bakteri *Shigella flexneri* dan Bakteri *Vibrio cholerae* mempunyai molekul adhesin yang berperan dalam proses pelekatan bakteri sel epitel usus besar. Molekul tersebut merupakan tahapan awal yang selanjutnya dapat memengaruhi sekresi toksin dan invasi dari bakteri yang dapat menimbulkan manifestasi diare yang memiliki ciri klinis berbeda antara diare karena *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae*. Progresivitas diare juga dipengaruhi oleh imunitas dari inang. Jika imunitas inang tersebut rendah, maka kemungkinan akan cenderung terjadi manifestasi diare apabila terinfeksi bakteri *Shigella flexneri* dan *Vibrio cholerae*. Sebaliknya, jika imunitas dari inang sedang baik, manifestasi klinis diare dapat dicegah. Imunitas inang dapat ditingkatkan dengan vaksinasi. Imunitas inang yang baik dapat ditandai dengan jumlah koloni yang menurun dari bakteri infeksi di usus besar.

*Shigella flexneri* memiliki molekul adhesin dengan berat molekul 49,8 kDa pada subunit pilinya, begitu juga dengan Bakteri *Vibrio cholerae* yang memiliki protein dengan berat molekul 37,8 kDa pada subunit pilinya, yang berperan dalam proses adhesi, Kedua molekul adhesin ini diketahui bersifat imunogenik dan bersifat protektif untuk mencegah diare pada mencit. Protein subunit pili 37,8 kDa pada *Vibrio* dan protein subunit pili 49,8 kDa pada *Shigella* merupakan molekul yang berperan dalam proses adhesi dan bersifat hemagglutinin, sehingga diduga berpotensi memiliki reaksi silang di antara keduanya.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

- 3.3.1 Pemberian vaksin molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* menurunkan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* pada usus mencit model diare *Vibrio cholerae*.
- 3.2.2 Terdapat reaksi silang antara molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* dengan molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *ex vivo* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*.

#### 4.2 Jumlah Sampel

Perhitungan pengulangan sampel menggunakan rumus Federer (1963) dalam (Wahyuni, 2008) adalah sebagai berikut:

$$(p - 1) (n - 1) \geq 15$$

p: jumlah perlakuan, n: jumlah pengulangan

pada penelitian ini  $p = 4$  sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(4 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Untuk setiap perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan sehingga total sampel yang dibutuhkan adalah 12 ekor tikus.

Kelompok	N	Induksi dan Perlakuan
Kontrol Positif Infeksi <i>Vibrio cholerae</i>	4	Tidak diberi vaksin molekul adhesin dan diinfeksi dengan <i>Vibrio cholerae</i>
Perlakuan 1	4	Diberikan vaksin molekul <i>Vibrio cholerae</i> dan diinfeksi dengan <i>Vibrio cholerae</i>
Perlakuan 2	4	Diberikan vaksin molekul adhesin <i>Shigella flexneri</i> dan diinfeksi <i>Vibrio cholerae</i>

### 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Laboratorium Biomedik FKUB, dan Laboratorium Farmakologi FKUB. Waktu penelitian dilaksanakan mulai sekitar bulan Desember 2017 sampai dengan November 2018.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian vaksin molekul adhesin *Shigella flexneri*.

#### 4.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri.

#### 4.5. Definisi Operasional

- a. **Mencit Balb/c:** Mencit jantan spesies *mus musculus* galur B albino *clone* (Balb/c) berumur kurang lebih 8 minggu dengan berat badan kurang lebih 28 gram.
- b. **Bakteri *Vibrio cholerae* 01 :** diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya.
- c. **Bakteri *Shigella flexneri*:** diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kemudian dikultur untuk diisolasi proteinnya.
- d. **Protein adhesi 37,8 kDa:** Protein pili yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit yang diisolasi dari subunit pili *Vibrio.cholerae* O1 melalui SDS-PAGE setelah dilakukan pemotongan dengan *pili cutter* di laboratorium Biomedik FKUB.
- e. **Protein adhesi 49,8 kDa:** Protein pili yang memperantarai perlekatan bakteri pada sel enterosit yang diisolasi dari subunit pili *Shigella flexneri* melalui SDS-PAGE setelah dilakukan pemotongan dengan *pili cutter* di laboratorium Biomedik FKUB.
- f. **Imunisasi protein adhesi konjugasi CTB:** Diberikan secara peroral pada mencit pada hari ke 7, 14, 21, dan 28, dimana proses konjugasinya

membutuhan 8 mg protein dalam 1,5 ml PBS dan CTB 0,230 mg dalam 1,5 ml PBS.

#### 4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

##### 1. Alat dan Bahan Kultur Bakteri

###### a. *Shigella flexneri*

Alat yang digunakan adalah plate agar, *scrap*, botol, *water bath*, inkubator. Bahan yang digunakan adalah agar Mac-Conkey atau Salmonella-shigella agar, phosphate-buffered saline (PBS) dengan pH 7.4, Thioprolin Carbonate Glutamate (TCG).

###### b. *Vibrio Cholerae*

Bahan yang digunakan adalah Medium Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar, medium TCG yang terdiri atas 0,02% thioprolin, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% monosodium l-glutamat, 1% bactotryptone, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan 1mM  $\beta$ -amino ethyl ether -N,N,N,"n",-tetra acetic acid (EGTA).

##### 2. Alat dan Bahan Untuk Isolasi Protein Pili

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk isolasi protein pili adalah botol *roux*, medium TCG, pili cutter, *tri chlor acetic acid* (TCA), sentrifugator, PBS, tabung wadah pili, vortex, dan *refrigerator* 4°C.

##### 3. Alat dan Bahan Deteksi Molekul Adhesin Sub Unit Pili 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dan Sub Unit 48,8 kDa *Shigella flexneri* Metode SDS PAGE

Alat dan bahan yang diperlukan adalah pipet, mikropipet, alat elektroforesis, Supernatant bakteri *P. gingivalis*, acrylamide 30%, SDS 10%, APS 10%, running buffer, EPS, TEMED, dan EtOH.

4. Alat dan Bahan Prosedur Perhitungan Jumlah Koloni

Pisau bedah, gunting bedah, pinset, PBS, *Potter homogenizer*, medium TCBS (*thiosulfate citrate bile sucrose*), inkubator, *colony counter*.

#### 4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

1. Prosedur Kultur Bakteri

a. Kultur *Shigella flexneri*

*Shigella flexneri* yang digunakan pada penelitian ini didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *S. flexneri* ditanam pada agar Mac-Conkey atau Salmonella-shigella agar sebagai media selektif. Bakteri *S. flexneri* dari Salmonella Shigella agar dilarutkan dalam 10 mL phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). Suspensi dari bakteri diambil dari scrapping. Botol dikocok selama 30 menit di water bath pada suhu 37°C. Sedangkan untuk pertumbuhan dari pili digunakan medium Thioprolin Carbonate Glutamate (TCG) yang diberi 10 ml suspensi dari bakteri dan diinkubasi selama 2 x 24 jam.

b. Kultur *Vibrio Cholerae*

Medium Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar digunakan sebagai media selektif. Sedangkan medium TCG digunakan untuk meningkatkan produksi dari pili *Vibrio cholerae*. Medium TCG terdiri dari 0,02% thioprolin, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>, 0,1%

monosodium l-glutamat, 1% bactotryptone, 0,2% yeast extract, 0,5% NaCl, 2% bacto agar dan 1mM  $\beta$ -amino ethyl ether –N, N, N,"n", - tetra acetic acid (EGTA). Lama inkubasi kultur dalam medium TCG adalah selama 2 x 24 jam.

## 2. Prosedur Isolasi Protein Pili

- a. Kultur bakteri dikumpulkan dari medium TCG sebanyak 20 botol roux.
- b. Bakteri yang dikumpulkan dari 20 botol roux medium TCG diresuspensi dengan TCA hingga mencapai konsentrasi 3%.
- c. Suspensi dikocok menggunakan vortex selama 30 detik dan didiamkan dalam suhu ruang selama 1 jam.
- d. Pelet bakteri diambil dari hasil sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.
- e. Tiga gram dari pelet diresuspensi menggunakan 6 ml PBS pH 7,4. Hasil resuspensi tersebut kemudian ditempatkan pada tabung hasil potongan pili.
- f. Setelah itu dilanjutkan series pemotongan kedua dengan pili cutter pada kecepatan 5000 rpm selama 30 detik dalam suhu 4°C.
- g. Isolasi pili bakteri dilanjutkan dengan sentrifugasi suspensi hasil potongan pili pada kecepatan 12,000 rpm selama 30 menit dalam suhu 4°C. Supernatan yang kaya protein pili bakteri dipisahkan dari pelet dan disimpan pada suhu 4°C.
- h. Pengumpulan supernatan hasil potongan kedua dan ketiga diisolasi dari pellet menggunakan prosedur yang sama dengan pemotongan pertama.



- i. Pengumpulan pili dilanjutkan dari series pemotongan ke empat hingga ke tujuh. Perbedaan antara pemotongan pertama dengan yang keempat hingga ke tujuh adalah kecepatan pili cutter yaitu 10,000 rpm selama 60 detik.
- j. Isolasi pili pada bakteri *Shigella flexneri* menggunakan prosedur yang sama dengan *Vibrio cholerae*

### 3. Prosedur SDS PAGE

- a. Sebagai persiapan SDS PAGE, dilakukan pembuatan *stacking gel* dan *separating gel*.
- b. Tuangkan *separating monomer solution* ke dalam *gel cassette*. Diamkan hingga gel mengeras.
- c. Tuangkan *stacking monomer solution* ke dalam *gel cassette* yang telah berisi *separating monomer solution*. Tambahkan ddH<sub>2</sub>O untuk meng-adjust volume.
- d. Pasang cetakan (comb) ke dalam gel casting, dan masukkan ke dalam chamber.
- e. Siapkan sampel yang akan digunakan. Tambahkan RSB (*Reducing Sample Buffer*) ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1. Panaskan selama kurang lebih 5 menit untuk mendenaturasi protein.
- f. Masukkan 10 µl marker protein ke dalam well. Masukkan sampel ke dalam masing-masing well yang telah tercetak (±15-20 µl/well). Running gel selama 35 menit dengan tegangan 200v, *constant voltage*. Perhatikan pergerakan marker protein dan *tracking dye* (berwarna biru).

- g. Jika *tracking dye* sudah mencapai garis hijau dari gel cassette, proses running dapat dihentikan.
- h. Lepaskan gel dari *gel cassette* secara perlahan. Masukkan ke dalam *staining box*.
- i. Tuangkan larutan *staining buffer* hingga gel terendam sempurna. Inkubasi selama  $\pm 4$  jam-overnight dalam shaker inkubator. Ganti larutan *staining buffer* dengan larutan *de-staining buffer*. Inkubasi dalam shaker inkubator hingga pita-pita protein tampak jelas.
- j. Setelah berat molekul dari protein pili berhasil teridentifikasi menggunakan SDS PAGE, pili dengan berat molekul 37,8 kDa *Vibrio cholerae* dan 49,8 kDa *Shigella flexneri* dipurifikasi menggunakan elektroelusi.
- k. Produk elusi didialisa selama 24 jam dalam *beaker glass* dengan PBS steril dan diaduk dalam suhu 4°C selama 24 jam.
- l. Protein yang didapatkan diendapkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 12,000 rpm dalam suhu 4°C selama 15 menit.

#### 4. Prosedur Perhitungan Jumlah Koloni

Pengukuran jumlah koloni pada hewan coba mencit menggunakan metode yang dikembangkan oleh Sumarno *et al* (2011) dengan tujuan untuk menilai jumlah ekskresi cairan oleh enterosit lumen ileal. Metode ini dikenal dengan *mice ligated ileal loop* (MLIL). Berikut adalah langkah-langkah prosedur MLIL:

- a. insisi abdominal secara vertikal lalu dilakukan isolasi intestinal dimulai dari kolon proksimal hingga rektum.
- b. Kolon dipotong menjadi 2 bagian yang terdiri dari 4 cm proksimal dan 4 cm distal. Kedua ujung usus lalu dilakukan ligasi ganda dan ditimbang.
- c. Setelah itu  $5 \times 10^9$  cfu/mL *Shigella flexneri* diinstilasi pada spesimen dalam 200 ml medium Roswell Pack Memorial Institute (RPMI) dan dihomogenisasi dalam suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 4 jam lalu ditimbang (Shim dan Kweon, 2008; Setyorini, 2013). Sedangkan pada model diare *Vibrio cholera*, setelah usus dipotong, diligasi, dan ditimbang.
- d. Spesimen lalu ditempatkan dalam botol 250 ml yang terisi oleh 200 ml larutan Hank's *balance salt* (HBSS),  $\text{NaHCO}_3$ , dan larutan HEPES atau diinfusi dengan PBS mengandung  $10^7$  *V. cholera/loop*.
- e. Dilakukan homogenisasi menggunakan *shaker* dengan laju agitasi 60 rpm dalam suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Mencit dengan rasio berat/panjang minimal 0,1 g/cm maka dinyatakan positif mengalami diare (Sumarno, 2011; Sawasvirojwong, 2013).

Untuk menghitung kolonisasi bakteri *Vibrio cholerae*, dilakukan tahapan lanjutan dari prosedur MLIL sebagai berikut:

- a. kolon yang telah dipapar dengan *Vibrio cholerae* selama 6 jam didiseksi untuk dilakukan pembersihan spesimen dari sisa feses menggunakan PBS (Shim dan Kweon, 2008).
- b. Kolon dipotong 10x10 mm dan diproses menggunakan Potter *homogenizer* dengan PBS steril dalam volume yang sama.

- c. 100  $\mu$ l suspensi homogenasi yang dihasilkan lalu ditanam pada medium selektif TCBS agar.
- d. TCBS agar diinkubasi selama 18 jam dalam suhu 37°C. Koloni *Vibrio cholerae* yang tumbuh akan berwarna kuning kecoklatan karena memfermentasi sukrosa yang menyebabkan perubahan pH medium. Setelah itu, koloni dihitung menggunakan *colony counter* (Schauer,2012)

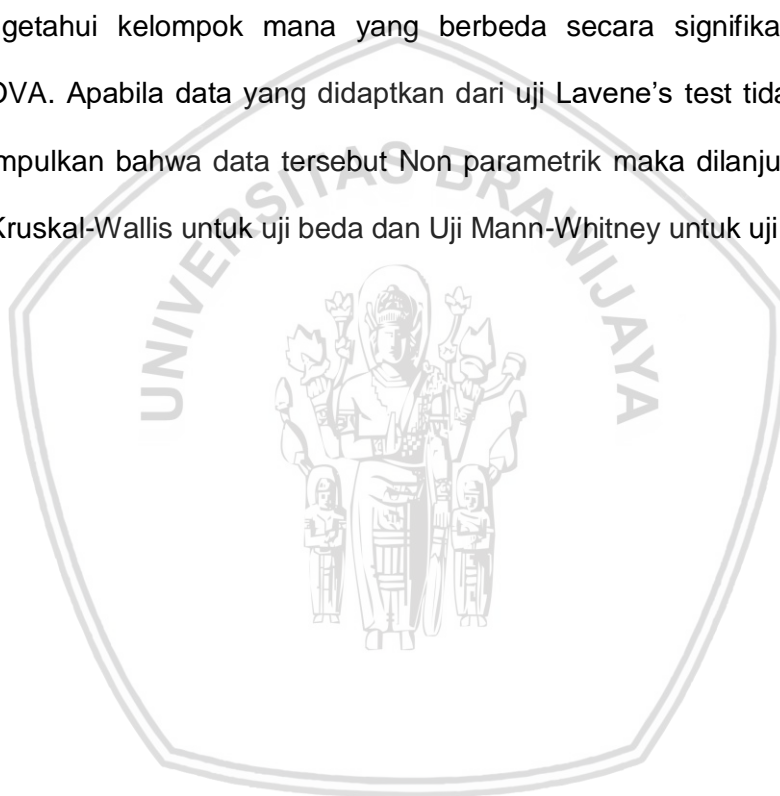
#### 4.8. Pengolahan Data

Pengambilan dan analisis data dilakukan setelah fase penelitian. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 23 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ( $p=0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut :

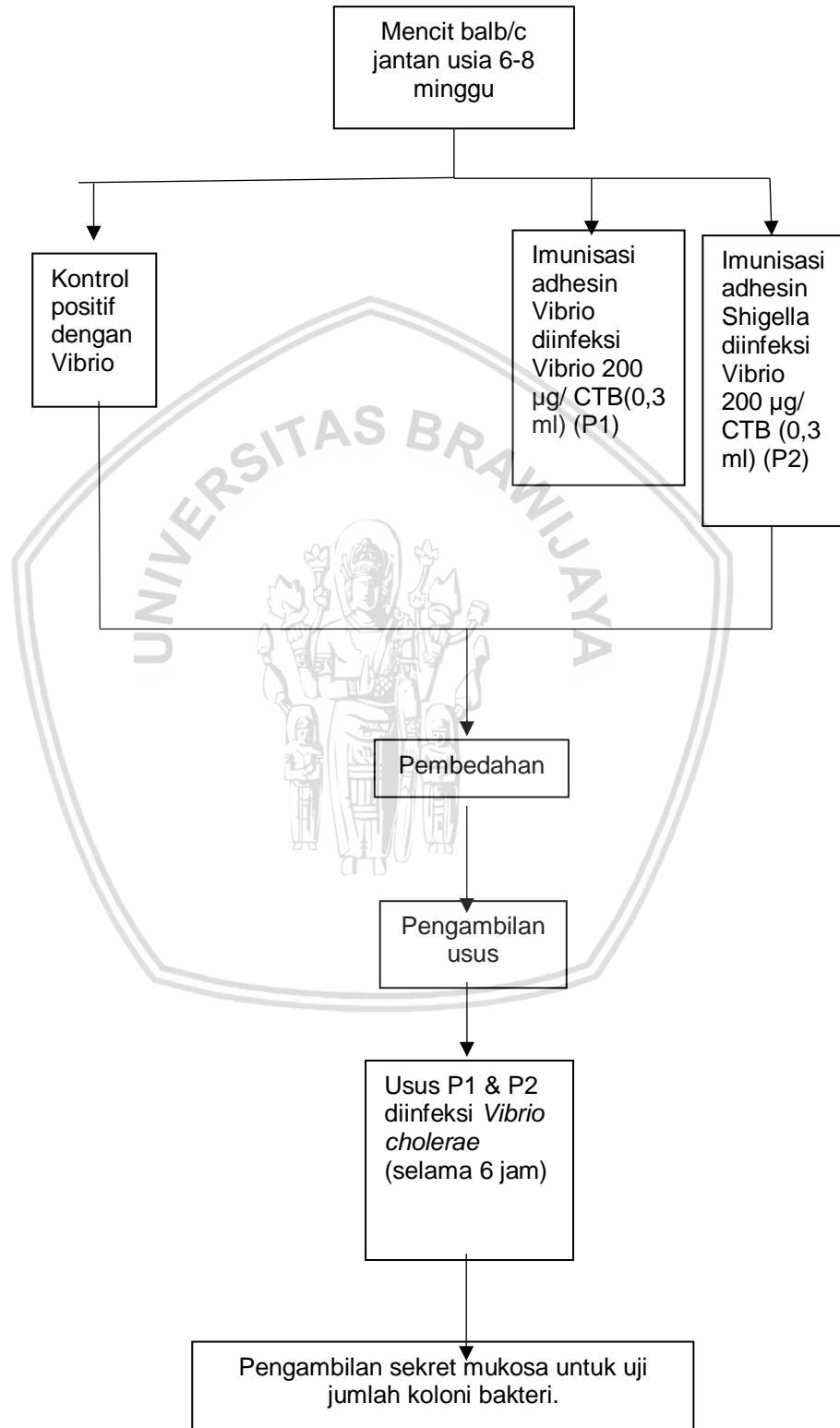
- a. Uji Normalitas (menggunakan uji *Saphiro-Wilk*): untuk menginterpretasikan suatu data apakah data memiliki persebaran data yang normal atau tidak karena uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Apabila didapatkan sebaran data normal maka dilanjutkan sebagai uji parametrik. Namun apabila sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik. Pada penelitian ini digunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel penelitian yang kurang dari 50 ( $n \leq 50$ ). Data dinyatakan memiliki persebaran normal dengan  $p > 0,05$ .
- b. Uji Homogenitas (menggunakan uji varians Levene's test) : untuk menentukan apakah distribusi beberapa set data memiliki varians yang homogen. Apabila didapatkan data memiliki varians homogen maka analisis data dilanjutkan

dengan uji ANOVA. Suatu data dinyatakan memiliki varians homogen dengan nilai signifikansi  $p > 0,05$ .

- c. Uji *One Way* ANOVA (dan uji *Post-Hoc* LSD dan Duncan) : uji *one way* ANOVA dilakukan untuk melakukan uji beda terhadap lebih dari dua kelompok data. Perbedaan pada dua kelompok dinyatakan bermakna dengan nilai  $p < 0.05$ . Kemudian analisis data dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil ANOVA. Apabila data yang didapatkan dari uji Lavene's test tidak homogen, Disimpulkan bahwa data tersebut Non parametrik maka dilanjutkan dengan Uji Kruskal-Wallis untuk uji beda dan Uji Mann-Whitney untuk uji signifikansi.



#### 4.9 Alur Penelitian





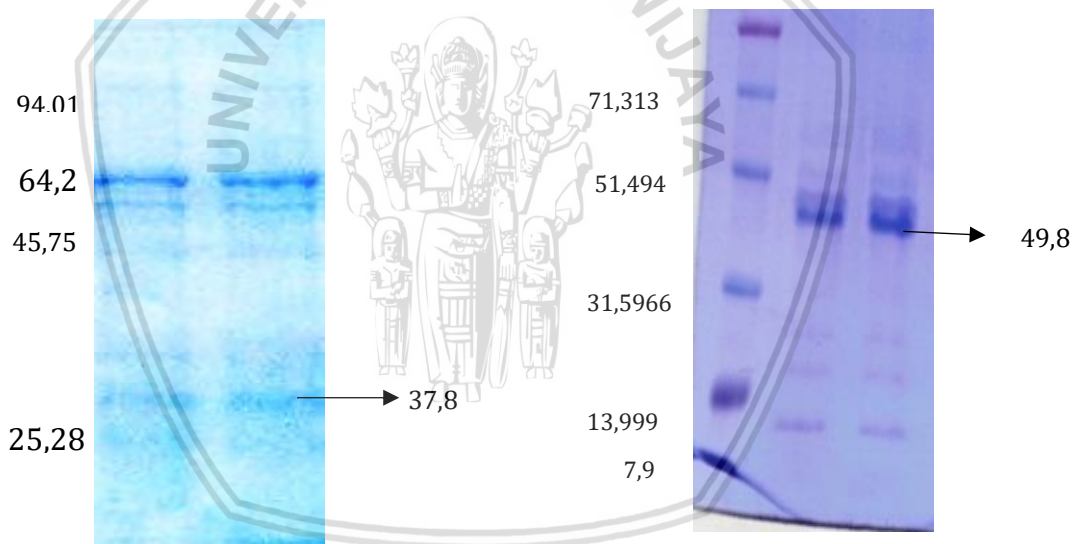
## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

Metode SDS PAGE adalah sebuah proses untuk memilah protein berdasarkan berat molekul yang diinginkan. Pada penelitian ini, didapatkan hasil pada Gambar 5.1 dan Gambar 5.2.



**Gambar 5.1 Hasil SDS PAGE molekul subunit pili *Vibrio cholerae*.**  
Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* didapatkan molekul Adhesin 37.8 kDa subunit pili *Vibrio cholera* yang merupakan molekul adhesin

**Gambar 5.2 Hasil SDS PAGE molekul sub unit pili *Shigella flexneri*.**  
Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* didapatkan Molekul Adhesin 49.8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* yang merupakan molekul adhesin

Digunakan molekul adhesin subunit pili *Shigella flexneri* dengan berat molekul 49,8 kDa dan *Vibrio cholerae* dengan berat molekul 37,8 kDa untuk produksi vaksin.

### 5.1.2 Hasil Purifikasi Protein dengan Elektroelusi

Purifikasi protein dengan elektroelusi berfungsi untuk mengisolasi protein dari bahan kimia lain. Setelah itu, dilanjutkan dengan prosedur uji *nanodrop* untuk mengetahui jumlah protein yang terkandung dalam 1 ml sampel. Hasil uji dapat dilihat pada table 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Nanodrop

Sample ID	Date	Time	mg/ml
<i>Shigella flexneri</i>	9/21/2018	10.40 AM	0,12
<i>Vibrio cholerae</i>	9/21/2018	10.38 AM	0,65

### 5.1.3 Hasil Penghitungan jumlah koloni

Untuk menghitung kolonisasi bakteri *Vibrio cholerae*, dilakukan tahapan lanjutan dari prosedur *mice ligated ileal loop* (MLIL). Usus yang telah dipapar dengan *Vibrio cholerae* didiseksi untuk dilakukan pembersihan spesimen dari sisa feses menggunakan PBS (Shim dan Kweon, 2008). Suspensi homogenasi yang dihasilkan lalu ditanam pada medium selektif TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*). TCBS diinkubasi selama 18-24 jam dalam suhu 37°C. Koloni yang tumbuh lalu diidentifikasi dan dihitung menggunakan *colony counter* (Setyorini, 2013).



5.3 Hasil Biakan Koloni dari sekret Ileum mencit yang diinfeksi *Vibrio cholerae* pada Media TCBS



Gambar 5.4 Hasil Biakan Koloni dari sekret Ileum mencit yang divaksin *Vibrio Cholerae* dan diinfeksi *Vibrio cholerae* pada Media TCBS



Gambar 5.5 Hasil Biakan Koloni dari sekret usus mencit yang divaksin *Shigella flexneri* dan diinfeksi *Vibrio cholerae* pada Media TCBS

Cara yang digunakan pada penelitian mengidentifikasi bakteri *Vibrio cholerae* adalah dengan mengamati koloni yang tumbuh pada TCBS. Hasil pengamatan yang ditemukan adalah koloni berwarna kuning. Setelah itu dilanjutkan dengan penghitungan jumlah koloni menggunakan *colony counter* dan didapatkan data berikut:

**Tabel 5.2 Hasil perhitungan jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada media TCBS menggunakan *colony counter*.**

NO	PERLAKUAN	Jumlah Koloni				
		1	2	3	4	5
1	Kontrol Postitif	40	39	34	58	49
2	Vaksin <i>vibrio</i> dan infeksi <i>vibrio</i> (P1)	0	0	0	0	-
3	Vaksin <i>Shigella</i> dan infeksi <i>vibrio</i> (P2)	0	0	0	0	0

## 5.2 Analisa Data

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan adanya reaksi silang respon imun antara molekul adhesin *Vibrio cholerae* dan *Shigella flexneri* dengan membuktikan adanya penurunan jumlah koloni pada secret usus mencit model diare *Vibrio cholerae* setelah divaksinasi dengan molekul adhesin 49,8 subunit pili *Shigella flexneri*.

### 5.2.1 Deskripsi Hasil *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel*

#### *Electrophoresis*

Proses SDS PAGE, protein terbagi berdasarkan berat molekulnya. Pada penelitian ini digunakan protein dengan berat molekul 37,8 kDa untuk *Vibrio cholerae* dan 49,8 kDa untuk *Shigella flexneri*. Protein ini selanjutnya akan digunakan sebagai antigen untuk menimbulkan antibodi pada mencit model diare *Vibrio cholerae*. Hal ini didasari pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa protein hemaglutinin subunit pili *Shigella* dengan berat molekul 49,8 kDa. Protein tersebut ternyata bersifat protektif untuk mencegah diare *Shigella* pada mencit (Sumarno *et al.* 2015). Pada *Shigella flexneri* juga ditemukan protein dengan berat molekul 7,9 kDa,

yang ternyata memiliki reaksi silang respon imun dengan protein sub unit pili berat molekul 49,8 kDa.

### 5.2.2 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Hasil dari penelitian ini dianalisis menggunakan software SPSS versi 24. Pada uji normalitas menggunakan uji saphiro-wilk karena jumlah sampel penelitian kurang dari 50 ( $n \leq 50$ ). Uji ini digunakan untuk menginterpretasikan suatu data apakah data memiliki persebaran data yang normal atau tidak karena uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Untuk uji Homogenitas digunakan uji varian Lavene's test untuk menentukan apakah distribusi beberapa set data memiliki varians homogen atau tidak. hasil uji dapat dilihat pada tabel.

**Tabel 5.3 Hasil uji normalitas**

Kelompok	Uji Saphiro Wilk		
	Statistic	Df	Sig.
Jumlah koloni	0.932	5	0,608

**Tabel 5.4 Hasil Uji Homogenitas**

Lavene statistic	Df1	Df2	Sig.
13.950	2	11	0,001

Dari Tabel diatas dapat dilihat pada uji normalitas didapatkan data distribusi normal ( $\text{sig} > 0,05$ ), namun pada uji homogenitas didapatkan data tidak homogen ( $\text{sig}$  tidak  $> 0,05$ ). Karena tidak homogen maka

digunakan statistik non parametrik dengan *kruskal wallis* dan *mann-whitney*.

### 5.2.3 Uji *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal Wallis* merupakan uji komparasi yang dilakukan jika data berupa nonparametrik. *Kruskal Wallis* berfungsi untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada media TCBS yang berasal dari secret usus mencit dengan perlakuan yang berbeda.

Hipotesis yang dibuat berdasarkan data yang ada adalah  $H_0$  dan  $H_1$ . Makna  $H_0$  dalam uji statistik ini adalah tidak terdapat jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada media TCBS yang berasal dari secret usus mencit dengan perlakuan yang berbeda. Makna  $H_1$  dalam uji statistik ini adalah terdapat perbedaan jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada media TCBS yang berasal dari secret usus mencit dengan perlakuan yang berbeda. Hasil  $H_0$  diterima jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) dan ditolak jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ). Hasil uji *Kruskal Wallis* dapat diamati pada Tabel 5.4.

**Tabel 5.5 Hasil Analisis Uji *Kruskal Wallis***

<i>Kruskal Wallis</i>	
Chi-Square	12.224
Probabilitas	0,002

Hasil dari *kruskal wallis* menunjukkan ada beda diantara kelompok variabel yang diteliti ( $\text{sig} < 0,05$ ) Nilai signifikansi yang didapat melalui uji ini



adalah 0,002. Nilai ini dapat memiliki arti bahwa  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Hasil analisis uji *Kruskal Wallis* dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri pada perlakuan yang berbeda.

#### 5.2.4 Uji *Mann-Whitney*

Uji *Mann-Whitney* merupakan uji komparasi berganda (*multiple comparison*). Uji ini dilakukan untuk mengetahui signifikan atau tidak, dengan membandingkan setiap dua perlakuan yang berbeda. Dalam penelitian ini, dilakukan dengan cara membandingkan hasil dari hitung jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada media TCBS yang berasal dari sekret usus mencit dengan perlakuan yang berbeda.

**Tabel 5.6 Hasil Analisis Uji *Mann-Whitney***

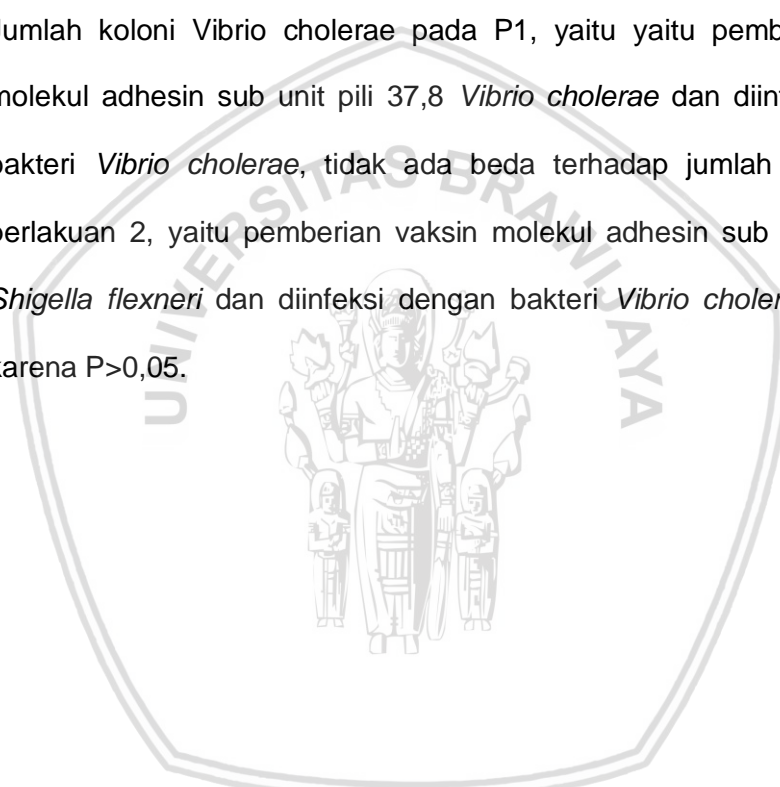
No	Perbandingan Antarperlakuan	Sig.	Kesimpulan
1.	Kontrol Vaksin <i>Vibrio cholera</i> , infeksi <i>Vibrio cholerae</i> (P1)	0,016	Turun Signifikan
2.	Kontrol Vaksin <i>Shigella flexneri</i> , infeksi <i>Vibrio cholerae</i> (P2)	0,008	Turun Signifikan
3.	Vaksin <i>Vibrio cholera</i> , infeksi <i>Vibrio cholerae</i> (P1) Vaksin <i>Shigella flexneri</i> , infeksi <i>Vibrio cholerae</i> (P2)	1,00	Tidak ada beda

Interpretasi dari hasil uji *Mann-Whitney* yang dapat dilihat pada tabel ringkasi di atas adalah sebagai berikut:

1. Jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada kontrol berbeda signifikan terhadap jumlah koloni pada perlakuan 1, yaitu pemberian vaksin molekul adhesin

sub unit pili 37,8 *Vibrio cholerae* dan diinfeksi dengan bakteri *Vibrio cholerae*. ( $P=0,016$ ), karena  $P<0,05$

2. Jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada kontrol berbeda signifikan terhadap jumlah koloni pada perlakuan 2, yaitu pemberian vaksin molekul adhesin sub unit pili 49,8 *Shigella flexneri* dan diinfeksi dengan bakteri *Vibrio cholerae* ( $P=0,008$ ), karena  $P<0,05$ .
3. Jumlah koloni *Vibrio cholerae* pada P1, yaitu yaitu pemberian vaksin molekul adhesin sub unit pili 37,8 *Vibrio cholerae* dan diinfeksi dengan bakteri *Vibrio cholerae*, tidak ada beda terhadap jumlah koloni pada perlakuan 2, yaitu pemberian vaksin molekul adhesin sub unit pili 49,8 *Shigella flexneri* dan diinfeksi dengan bakteri *Vibrio cholerae* ( $P=1,00$ ), karena  $P>0,05$ .



## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian molekul adhesin 49,8 sub unit pili *Shigella flexneri* terhadap penurunan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* pada usus mencit model diare *Vibrio cholerae*. Pemilihan berat molekul 49,8 kDa dengan *SDS page* pada *Shigella flexneri* didasari dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa protein 49,8 kDa *Shigella dysenteriae* merupakan protein hemagglutinin (Fitrianingsih, 2017). Kemudian pada penelitian yang lain, dilakukan uji hemagglutinasinya pada *Shigella flexneri*, dan hasilnya titer tertinggi ditemukan pada berat molekul 49,8 kDa (Anam, 2016). Pada *Vibrio cholerae*, penelitian sebelumnya menemukan bahwa molekul adhesin dengan berat molekul 37,8 kDa merupakan protein hemagglutinin (Sumarno, 2000). Protein tersebut mempunyai sifat yang protektif dalam hal mencegah diare *Shigella* pada enterosit mencit. Pada penelitian tersebut selain ditemukan protein dengan berat molekul 49,8 kDa, pada pili *Shigella flexneri* juga ditemukan molekul adhesin dengan berat molekul 7,9 kDa, yang ternyata memiliki reaksi silang dengan subunit pili berat molekul 49,8 kDa (Khoirul *et al.*, 2015).

Pada *Shigella flexneri* maupun *Vibrio cholerae*, keduanya sama-sama memiliki protein *hemagglutinin* (HA). Pada *Vibrio cholerae*, protein hemagglutinin subunit pili 37,8 kDa adalah molekul adhesin dan merupakan kandidat untuk pembentukan vaksin kolera (Sumarno dkk., 2011). Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa antibodi protein hemagglutinin subunit pili *Shigella dysenteriae* 49,8 kDa dapat menghambat adhesi *Shigella dysenteriae* ke enterosit mencit sehingga tidak terjadi proses infeksi (Agustina dkk., 2012). Hal ini mengindikasikan bahwa protein HA subunit pili 49,8 kDa pada *Shigella flexneri* juga memiliki sifat protektif seperti *Shigella dysenteriae*. Ditemukannya beberapa kesamaan pada kedua bakteri menimbulkan dugaan bahwa molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri* identik dengan molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholerae* serta apakah keduanya bisa saling memberikan reaksi silang.

Terdapat 3 perlakuan dalam penelitian ini, perlakuan pertama atau disebut kontrol positif, yaitu usus mencit yang diinjeksi bakteri *Vibrio cholerae* yang belum dipapar molekul adhesin sebelumnya. Perlakuan selanjutnya, yaitu usus mencit yang diinjeksi oleh bakteri *Vibrio cholerae* dan sudah diberi protein molekul adhesin 37,8 kDa sub unit pili *Vibrio cholerae* (P1), serta usus mencit yang diinfeksi bakteri *Vibrio cholerae* dan sudah divaksinasi dengan protein molekul adhesin 49,8 sub unit pili *Shigella flexneri* (P3). Pada perlakuan kontrol positif, dapat dilihat terjadi peningkatan jumlah bakteri *Vibrio cholerae*, ini membuktikan bahwa

paparan infeksi Bakteri berhasil. Selanjutnya, perbandingan kelompok yang diberi imunisasi molekul 37,8 kDa sub unit pili *Vibrio cholerae* dengan kelompok kontrol positif menunjukkan penurunan yang signifikan dibanding kontrol positif. Hal tersebut menunjukkan keberhasilan pemberian imunisasi molekul adhesin *Vibrio cholerae* terhadap paparan *Vibrio cholerae*. Hasil berikutnya dapat dilihat dari perbandingan kelompok pemberian molekul adhesin 49,8 kDa sub unit pili *Shigella flexneri* dengan kelompok kontrol positif. Hasil perbandingan kelompok dengan pemberian imunisasi molekul adhesi *Shigella flexneri* secara signifikan menurun dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan keberhasilan pemberian protein molekul adhesin 49,8 kDa *Shigella flexneri* terhadap paparan *Vibrio cholerae*. Hal tersebut membuktikan Pemberian protein molekul adhesin *Shigella flexnerii* dan molekul adhesin *Vibrio cholerae* sangat baik dalam menurunkan jumlah koloni pada paparan mencit dengan bakteri *Vibrio cholerae*, namun tidak dapat dibuktikan dalam segi efektifitas dikarenakan pada uji statistik tidak didapatkan perbedaan.

Berdasarkan landasan teori dan pembahasan hasil yang didukung dengan uji statistik, dapat disimpulkan bahwa ada potensi reaksi silang yang kuat antara keduanya. Hal ini didukung dengan kesamaan sifat yang erat antara molekul adhesi 37.8 kDa *Vibrio cholerae* dan molekul adhesin 49.8 kDa *Shigella flexneri*. kedua molekul tersebut bersifat protektif terhadap paparan bakteri *Vibrio cholerae*. Hal tersebut menjadikan alasan

yang kuat untuk terciptanya kandidat vaksin baru pada penyakit diare dimasa depan.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah Perlu memastikan jumlah koloni awal yang diberikan pada enterosit tikus jumlahnya sama meskipun sudah ditangani dengan menyamakan suspensi injeksi yang diberikan pada tiap perlakuan akan tetapi perlu adanya standar untuk mengukur jumlah bakteri yang berada di enterosit sama pada setiap perlakuan.



## BAB 7

### KESIMPULAN

#### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah

1. ada potensi terjadinya reaksi silang respon imun respon imun antara molekul adhesin 37,8 kDa subunit pili *Vibrio cholera* dengan molekul adhesin 49,8 kDa subunit pili *Shigella flexneri*
2. adanya penurunan jumlah koloni bakteri *Vibrio cholerae* pada sekret usus halus mencit model diare *Vibrio cholerae* pada saat pemberian molekul adhesin 49,8 kDa sub unit pili *Shigella flexneri*.

#### 7.2 Saran

Saran pada penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji efektivitas tahapan terhadap waktu pemberian atau paparan pada bakteri *Vibrio choerae* sehingga dapat diketahui efektivitas paparan masing-masing protein molekul adhesin.



## DAFTAR PUSTAKA

Bär, E., Whitney, P.G., Moor, K., e Sousa, C.R. and LeibundGut-Landmann, S., 2014. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity*, 40(1), pp.117-127.

Beringer, A., Noack, M. and Miossec, P., 2016. IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Trends in molecular medicine*, 22(3), pp.230-241.

Bhunja, A. 2008. *Foodborne Microbial Pathogens: mechanisms and pathogenesis*. 1<sup>st</sup> Ed. Springer, New York, p. 253-365

Brooks, GF., Jawetz, E., Melnick, JL., & Adelberg, EA. 2013. *Jawetz, Melnick& Adelberg's medical microbiology*. 26<sup>th</sup> Ed. Mc-GrawHill Medical, New York, p. 229-241

Cătană, C.S., Neagoe, I.B., Cozma, V., Magdaş, C., Tăbăran, F. and Dumitraşcu, D.L., 2015. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(19), p.5823.

Fitrianingsih, A.A., Rachma, L.N., Milliana, A., Hernowati, T.E., Santoso, S. and Prawiro, S.R., 2017. Cross Reaction among Antibody Pili sub unit Hemagglutinin Proteins and Outer Membrane sub unit Hemagglutinin Proteins of *Shigella flexneri*. *Journal of Tropical Life Science*, 7(1), pp.1-7.

Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V. and Cua, D.J., 2014. IL-23-IL-17 immune axis: discovery, mechanistic understanding, and clinical testing. *Nature reviews. Immunology*, 14(9), p.585.

Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K. and LeibundGut-Landmann, S., 2013. Cutting edge: IL-17-secreting innate

lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *The Journal of Immunology*, 190(2), pp.521-525.

Goulding, D. 2011. *Pathogens and disease*, Wellcome Trust Sanger Institute, London.

<https://wellcomeimages.org/indexplus/gallery/Pathogens%20and%20disease.html?f=16&vf=1>. Diakses pada 16 April 2017

Gustiani, E. (2009) 'Pengendalian Cemaran Mikroba pada Bahan Pangan Asal Ternak (Daging dan Susu) Mulai dari Peternakan Sampai Dihidangkan', *Jurnal Litbang Pertanian*, 28(80), pp. 96–100.

Holmgren, J. and Czerkinsky, C., 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, 11, pp.S45-S53.

Jennison, AV., Verma, NK. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev.* 2004:43-58

Jin, W. and Dong, C., 2013. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging microbes & infections*, 2(9), p.e60.

Kang, JO., Lee, JB., Chang. Cholera toxin promotes Th17 cell differentiation by modulating expression of polarizing cytokines and the antigen-presenting potential of dendritic cells. *Plos One*. 2016;1(6):e0157015

Kementerian Kesehatan RI (2011) 'Situasi diare di Indonesia', Buletin jendela data & informasi kesehatan, 2, pp. 1–44.

Kerr, JR. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of host defense against microbial infection. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1999;S2:220-230

Kulsantiwong, P., Pudla, M., Boondit, J., Wikraiphat, C., Dunachie, S.J., Chantratita, N. and Utaisinchaoen, P., 2016. Burkholderia

pseudomallei induces IL-23 production in primary human monocytes. *Medical microbiology and immunology*, 205(3), pp.255-260.

Levinson, W. 2014. *Review of medical microbiology and immunology*. 13<sup>th</sup> Ed. McGraw Hill Education, New York, p. 1097-9

Locht, C., 2016. Live pertussis vaccines: will they protect against carriage and spread of pertussis. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, pp.S96-S102.

Mao, Y., Cui E., Bao, C., Liu, Z., Chen, S., Zhang, J., Wang, H., et al. Changing trends and serotype distribution of *Shigella* species in Beijing from 1994 to 2010. *Gut Pathogens*. 2013;5:21

Meller, S., Domizio, JD., Voo KS., Friedrich, HC., Chamilos, G., Ganguly, D., Conrad, C., et al. Th17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat Immunol*. 2015;26:1-8

Miliana, A., Noorhamdani AS., Poeranto, S., Handono, K., Prawiro, SR., Fitrianiingsih, AA., Rachma, LN. Antibodies against *Shigella flexneri* adhesion molecule outer membrane protein (OMP) can cross-react with OMPs of some *Shigella* species. *Tropical Journal of Pharm Res*. 2017;16(2):255-261

Muranski, P., Restifo, NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121:2402-12

Nafianti, S. and Sinuhaji, A. B. (2005) 'Resisten Trimetoprim – Sulfametoksazol terhadap Shigellosis', *Sari Pediatri*, 7(1), pp. 39–44. Available at: <http://saripediatri.idai.or.id/pdf/7-1-7.pdf>.

Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, S.P. and Raffatellu, M., 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nature Reviews Immunology*, 16(3), pp.135-148.

Pengantar, K., Penelitian, B. and Pengantar, K. (2008) 'Riset Kesehatan Dasar'

Pulendran, B. and Ahmed, R., 2011. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature immunology*, 12(6), pp.509-517.

Ribet, D. and Cossart, P., 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17(3), pp.173-183.

Rutz, S., Eidenschenk, C., Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Rev.* 2013;252:116-132

Ryan, K., Ray, CG., et al. 2014. *Sherris medical microbiology*. 6<sup>th</sup> Ed. McGraw Hill Education, New York, p. 596-8

Sabat, R., Ouyang, W., Wolk, K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Reviews Drug Disc.* 2014;13:21-38

Sansonetti, PJ. Shigellosis: From symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280: G319-G323

Sellge, G., Magalhaes, JG., Konradt, C., Fritz, JH., Pabon, WS., Eberl, G., Bandeira, A. et al. Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by *Shigella flexneri* mediating protective immunity. *The Journal of Immunology.* 2010;184:2076-85

Shabgah, A.G., Fattahi, E. and Shahneh, F.Z., 2014. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *receptor*, 51(17F), p.12.

Siegrist, C.A., 2008. Vaccine immunology. *Vaccines*, 5, p.1725.

Singh, S., Kroe-Barrett, R.R., Canada, K.A., Zhu, X., Sepulveda, E., Wu, H., He, Y., Raymond, E.L., Ahlberg, J., Frego, L.E. and Amodeo, L.M., 2015, July. Selective targeting of the IL23

pathway: Generation and characterization of a novel high-affinity humanized anti- IL23A antibody. In *MAbs* (Vol. 7, No. 4, pp. 778-791). Taylor & Francis.

Sumarno, 2003. Molecular weight of protein receptor of vibrio cholerae O1 M094V in enterocyte of rat. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 11(8), 20-29.

Sumarno, R.P., Avanita, A.S., Winarsih, S., Hidayat, S. and Nurhidayati, D.Y., 2015. Haemagglutination of *Shigella dysenteriae* subunit pili protein with anti- haemagglutination of *S. dysenteriae* subunit pili protein as a molecule adhesion in mouse enterocytes. *African Journal of Microbiology Research*, 9(11), pp.781-787.

Suzuki, E., Mellins, E.D., Gershwin, M.E., Nestle, F.O. and Adamopoulos, I.E., 2014. The IL-23/IL-17 axis in psoriatic arthritis. *Autoimmunity reviews*, 13(4), pp.496-502.

Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., Krczmarczyk, A., Pozarowski, P., Giannopoulos, K. The role of IL-17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63:435-449

World Health Organization, 2009. The Immunological basis for Immunization Series. Module 4: Pertussis. *Update*.

Zein, U. (2004) 'Diare Akut Infeksius Pada Dewasa', Universitas Stuttgart, 5(Tabel 1), pp. 1–8.